

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-142767

(43)Date of publication of application : 21.05.2002

(51)Int.Cl.

C12N 15/09

C12Q 1/68

(21)Application number : 2000-338111

(71)Applicant : FUJIREBIO INC

(22)Date of filing : 06.11.2000

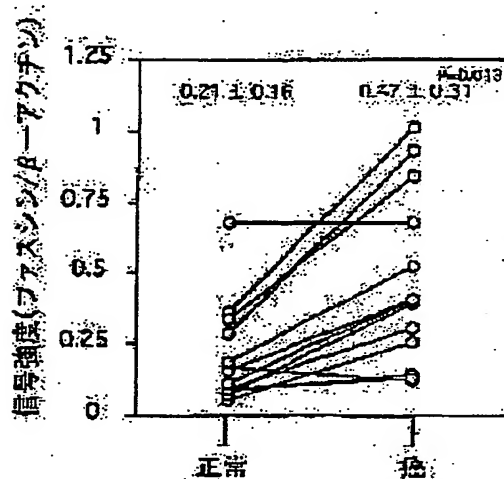
(72)Inventor : OKADA FUTOSHI  
HOSOKAWA MASUO  
ITO SATORU

## (54) METHOD FOR DETECTING CANCER AND METHOD FOR DETERMINING WHETHER CARCINOGENESIS ADVANCE OR NOT

## (57)Abstract

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for detecting cancer, by which early cancer can be detected and a method for determining whether advance of carcinogenesis from pre-cancer condition is present or not.

SOLUTION: This method for detecting cancer comprises examining developing amount of fascin of collected cell to be examined or humor.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-142767

(P2002-142767A)

(43) 公開日 平成14年5月21日 (2002.5.21)

(51) Int. Cl.

C12N 15/09

C12Q 1/68

識別記号

ZNA

F I

C12Q 1/68

C12N 15/00

テマコード (参考)

A 4B024

ZNAA 4B063

審査請求 未請求 請求項の数12 OL (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願2000-338111(P2000-338111)

(22) 出願日 平成12年11月6日 (2000.11.6)

(71) 出願人 000237204

富士テレビオ株式会社

東京都中央区日本橋浜町2丁目62番5号

(72) 発明者 岡田 太

北海道札幌市北区北8条西7丁目中央第一  
公務員宿舍13-21

(72) 発明者 細川 眞澄男

北海道札幌市西区八軒5条西2丁目5の1

(72) 発明者 伊藤 哲

東京都中央区日本橋浜町2丁目62番5号  
富士テレビオ株式会社内

(74) 代理人 100088546

弁理士 谷川 英次郎

最終頁に続く

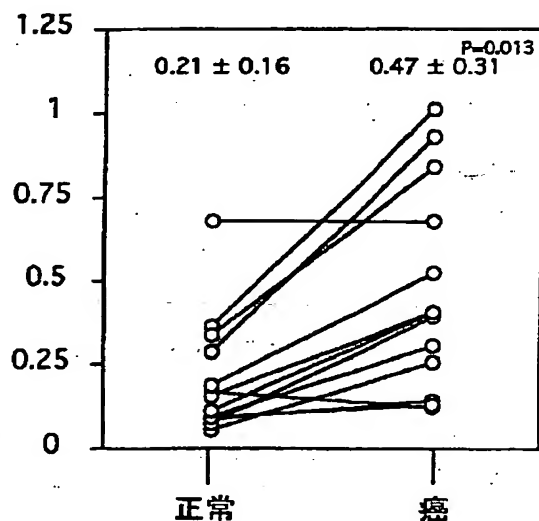
(54) 【発明の名称】 癌の検出方法及び癌化の進行の有無の判定方法

(57) 【要約】

【課題】 早期癌を検出することが可能な癌の検出方法及び前癌状態から癌化の進行の有無の判定方法を提供すること。

【解決手段】 採取された被検細胞又は体液中のファスシンの発現量を調べる。

信号強度(ファスシン/ $\beta$ -アクトニン)



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 採取された被検細胞又は体液中のファスシンの発現量を調べることから成る、癌の検出方法。

【請求項2】 被検細胞中のファスシンの発現量を調べることにより行われる請求項1記載の方法。

【請求項3】 被検細胞中のファスシンの発現量を調べることが、被検細胞中のファスシン遺伝子のmRNAの量を調べることにより行われる請求項1又は2記載の方法。

【請求項4】 被検細胞又は体液中のファスシンの発現量を調べることは、ファスシンタンパク質の量を調べることにより行われる請求項1記載の方法。

【請求項5】 前記被検細胞は臓器癌の細胞であり、前記癌は臓器癌である請求項1ないし4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】 前記臓器癌は大腸癌である請求項5記載の方法。

【請求項7】 採取された被検細胞又は体液中のファスシンの発現量を調べることから成る、癌化の進行の有無の判定方法。

【請求項8】 被検細胞中のファスシンの発現量を調べることにより行われる請求項7記載の方法。

【請求項9】 被検細胞中のファスシンの発現量を調べることが、被検細胞中のファスシン遺伝子のmRNAの量を調べることにより行われる請求項7又は8記載の方法。

【請求項10】 被検細胞又は体液中のファスシンの発現量を調べることは、ファスシンタンパク質の量を調べることにより行われる請求項7記載の方法。

【請求項11】 前記被検細胞は臓器癌の細胞であり、前記癌は臓器癌である請求項7ないし10のいずれか1項に記載の方法。

【請求項12】 前記臓器癌は大腸癌である請求項11記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、癌の検出方法及び癌化の進行の有無の判定方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】正常大腸粘膜から大腸腺腫へ、さらにこれから大腸癌へと進展して行くには遺伝子の多段階変異によることが明らかにされてきた(ER. Fearon, Prince ss Takamatsu Symp., 22, 37-48 (1991)、癌と化学療法、20, 677-683 (1993))。即ち、まずAPC & MCC 遺伝子変異が起こり、続いてK-ras遺伝子の変異が、更にはp53遺伝子変異が積み重なって生じることが癌化への道筋であるとの仮説が提唱された(ER. Fearon and B. Vogelstein, Cell, 61, 759-767, (1990))。このように細胞内での不可逆的遺伝子の変異が積み重ねられることにより、癌化への道が進むと説明されている。これら

の現象は単に大腸癌のみではなく多くの主要臓器癌についても一般的に適用される理論として理解されている(A. L. Jackson & L.A. Loeb, Semin. Cancer Biol., 8, 421-429 (1998))。従って早期癌の検出にはより早い段階の遺伝子変化の検出が極めて重要とされている。しかし、現実には正常組織もしくは前癌病変から癌へと進展するモデル系が少なく、患者負担が少なく臨床的に有用な検査マーカー検索には臨床材料として、非腫瘍組織から癌に至るまでの同一個体から得られる一連の組織バンクが欠如している為に、なかなか研究自体が進展していない現状である。即ち、より早期治療を考えた場合の、より早期での癌化マーカーには依然として要求を満足させている状況にはない。癌の悪性化のマーカー検索には新しい技術であるgene-chipを用いて、高転移性株と低転移性株をペア株として用いる事で関係する遺伝子発現プロファイル解析技術が盛んに用いられて注目を集めている(Nature, 406, 466-467 (2000) & Nature, 406, 532-535 (2000))。しかし、早期癌マーカー検索の為に肝心のペア株バンクが欠落している為に研究が進んでいない。

【0003】現在広く利用されている血清中の腫瘍マーカー(例えばCEAやCA19-9という血清レベルでのマーカー)測定も、現実的には早期癌を検出できるレベルからは程遠く、現状では手術・予後予測或いは治療のモニタリングとして利用される事が殆どである(Ann. J. Gastroenterol., 91, 49-53 (1996))。従って早期癌検出に期待ができる新規マーカーの提供が臨床現場から強く求められている。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、早期癌を検出することが可能な癌の検出方法及び前癌状態から癌化の進行の有無の判定方法を提供することである。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】本願発明者らは、後述の実施例において詳述するように、大腸腺腫から大腸癌への移行には、炎症が必要であり、慢性炎症が癌化を促進する要因となることを明らかにした。そして、癌化を促進する、細胞間質に含まれる液性因子がファスシン(fascin)であることを、前癌状態にある細胞と癌化した細胞との二次元電気泳動による比較により同定した。さらに、今回樹立した大腸癌セルライン及び公知の大腸癌セルラインの全てにおいて、細胞中のファスシン遺伝子のmRNA量が、前癌状態にある細胞中のファスシン遺伝子のmRNA量よりも明らかに増大していることを見出した。そして、ファスシンの発現量を調べることにより癌を検出することが可能なことに想到し、本発明を完成した。

【0006】すなわち、本発明は、採取された被検細胞又は体液中のファスシンの発現量を調べることから成る癌の検出方法を提供する。また、本発明は、採取された

被検細胞又は体液中のファスシンの発現量を調べることから成る、被検細胞の癌の進行の有無の判定方法を提供する。

#### 【0007】

【発明の実施の形態】上記の通り、本発明の方法では、採取された被検細胞又は体液中のファスシンの発現量を調べる。ファスシン自体の発見は古く、その遺伝子配列・構造も種々動物種間でのホモロジー保存関係情報まで良く研究解析されてきた（参考総説：Cell Motility and the Cytoskeleton, 32, 19 (1995)）。その機能は

アクチン繊維を束ねる役目が主であると理解されてきた。即ち、アクチンが細胞膜の裏打ち蛋白質として機能することから、これらを調節する蛋白質も細胞の運動能と密接に関係している事が推察される。なお、ファスシンをコードするcDNAの塩基配列は、GenBank Accession No. AF030165に記載されている（配列番号5）。

【0008】本発明の方法では、ファスシンの発現量を調べるが、ここで「調べる」方法には、癌化していない細胞と比較してファスシンの発現量が增大しているか否かを知ることができるあらゆる方法が包含される。必ずしも、発現量を定量する必要はなく、例えば、癌化していない細胞ではファスシンが検出されないような測定感度の方法によりファスシンを検出する場合も包含される。

【0009】ファスシンの発現量を調べる方法としては、細胞内におけるファスシン遺伝子のmRNA量を調べることが挙げられる。ファスシン遺伝子のcDNA配列は、上記の通り既に公知であるので、これは周知のRT-PCR法やNASBA法、TMA法等の核酸増幅方法によりファスシンmRNAを増幅し、増幅産物の量を調べたり、これらの核酸増幅方法をコントロール遺伝子のmRNAの増幅と同時にやり、その増幅産物の量を比較したり（Duple x PCR等）することにより行うことができる。これは、増幅バンドの濃さを比較したり、核酸増幅法に用いるヌクレオチドに蛍光標識等の標識を付しておき、増幅産物を電気泳動で分離した後、増幅バンド中の標識を測定することにより行うことが可能である。あるいは、TaqMan（商品名）プローブを用いた周知のリアルタイム検出RT-PCR法によりmRNA量を測定することもできる。また、ファスシンの発現量は、ファスシンタンパク質の量を調べることによっても調べることができる。これは、周知の免疫測定法や、二次元電気泳動、クロマトグラフィー等の周知のタンパク質精製方法を行ってファスシンタンパク質を検出することにより行うことができる。

【0010】本発明の方法に供される被検細胞としては、特に限定されないが、臓器を構成する細胞が好ましく、臓器を構成する細胞を被検細胞とすることにより、臓器癌を早期に検出することが可能になる。臓器の癌化のプロセスは、上記の通り、遺伝子の変異が積み重なっ

ていくものであり、このような癌化のプロセスは種々の臓器において基本的に共通しているので、本発明の方法に供される臓器細胞は何ら限定されない。好ましい例としては、大腸、小腸、胃、十二指腸等の消化器を挙げることができ、特に好ましい例として大腸を挙げることができる。

【0011】本発明の方法では、被検細胞内におけるファスシンの発現量を上記のような方法により調べることが好ましい。被検細胞は、バイオブシーにより臓器から採取することによっても採取することができるし、消化器官の細胞を調べる場合には、糞便中に脱落する細胞片を被検細胞として利用することもできる。また、ファスシンは、細胞から浸出するので、検査対象となる臓器の近傍の体液や、消化器癌の場合には糞便（本明細書において、糞便も体液に含める）中のファスシンの量を調べることによってもファスシンの発現量を調べることができる。あるいは、血液等の循環体液中のファスシン量を調べることも可能である。この場合には、どの臓器が癌化しているのかはわからないが、どこかの臓器が癌化しているか否かの一次スクリーニング検査として利用可能である。

【0012】下記実施例において具体的に示されるように、前癌状態から癌への移行をファスシンが促進することから、ファスシンの発現を指標とする本発明の方法によれば、早期癌を検出することが可能になる。

【0013】また、上記の方法によって、被検細胞の癌化の進行の有無の判定が可能になる。すなわち、形態的に癌化されていない細胞であっても、ファスシンの発現量が增大していれば、癌化が進行しつつあるということが判定できる。

#### 【0014】

【実施例】以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

#### 【0015】1. 悪性化細胞の樹立

a. ヒト大腸腺腫細胞は、癌研究会癌研究所北川知行博士より供与を受けたものを使用した。（この細胞は家族性大腸腺腫症患者のポリープから樹立したものでFPCK-1と名付けられている）。培養条件下での増殖性が極めて低下していることから、MNNG処理して（比較的）増殖能の高い亜株を数系を分離した。供与を受けた細胞株は親細胞FPCK-1とその亜株FPCK-1-1とFPCK-1-5の計3系である。

【0016】b. いずれの細胞株もヌードマウスに5 x 10<sup>6</sup>個皮下移植しても生着しなかった。しかし炎症を惹起させる異物（ゼラチンスポンジ或いはプラスチックプレート）とともに皮下移植すると生着する事が判明した。即ち、生体内吸収性のゼラチンスポンジは皮下移植後約1ヶ月に消失するが、このゼラチンスポンジ（10x5 x3mm）を皮下に挿入し、そのスポンジ内に5 x 10<sup>6</sup>個

の大腸腺腫細胞を移植すると、FPCK-1-1細胞のみが12匹中1匹のマウスに大腸癌として生着した。しかしFPCK-1やFPCK-1-5は生着しなかった。

【0017】c. 次に $1 \times 10^5$ 個の大腸腺腫細胞をプラスチックプレート(10x5x1mm)上に付着させ、これをプラスチックプレートごと皮下に移入すると、FPCK-1細胞は生着せず、FPCK-1-5細胞は20匹中1匹のマウスに大腸癌として増殖し、FPCK-1-1細胞は20匹中13匹に大腸癌として増殖した。

【0018】d. また、FPCK-1-1細胞の大腸癌への癌化には遷延した炎症が必要であることが判明した。なぜならば、約1ヶ月の炎症にさらされただけでは癌化せず、常に遷延した炎症と共存し続けることで癌化を起こすことが上述の結果より想定される。また、プラスチックプレートのみをヌードマウス皮下に移入し100日後にプラスチックプレートのみを取り除きプラスチックプレート周囲に付着増生する間質細胞を皮下に留置させ、この間質組織中にFPCK-1-1細胞を $5 \times 10^5$ 個移植しても6例全てに癌化増殖することから、慢性炎症が癌化を促進する要因となることを明らかにした。プラスチックプレートに付着したFPCK-1-1が慢性炎症によって癌化した細胞を培養株に樹立し、FPCKpP1-1~FPCKpP1-6と名付けた。

【0019】2. 炎症部位をベッドにして形質転換させた癌細胞とその形質の特徴

a. 大腸腺腫細胞から大腸癌への癌化頻度の違いは、大腸腺腫細胞の遺伝子変異の程度の違いとして考えられる。そこで遺伝子変異検出実験を行った所、FPCK-1細胞はAPC遺伝子の生殖細胞系列、体細胞のいずれも突然変異を持つが、他のras, p53などの突然変異はなく、また染色体1p, 5p, 5q, 11p, 12p, 17p, 18p, 18q, 22qのLOHも観察されないのに対し、FPCK-1-1細胞では、17, 18p, 18qのLOHが加算されている。FPCK-1-5細胞では調べた範囲内においてFPCK-1と同様であった。尚LOH検出はMiyaki, M. et al., Cancer Res., 50: 7166-7173, 1990並びにKawaguchi et al., Jpn. J. Cancer Res., 82: 138-141, 1991に従い、通常の多型DNAマーカーをプローブに用い、サザンブロッティングにて判定した。

【0020】b. FPCK-1-1細胞のプラスチックプレート付着移植による癌化モデルにiNOS阻害剤アミノグアニジン(AG)を1%含有する飲料水として投与すると、腫瘍出現までにかかる平均潜伏期間が97.9 +/- 31.2日であるのに対し、非投与では44.8 +/- 12.5日と有意に延長し、しかも生着したがん細胞の増殖を移植後150日目に平均腫瘍体積を比較すると、AG投与群では28.4 +/- 19.7 mm<sup>3</sup>であるのに対し、非投与群では68.8 +/- 45.8 mm<sup>3</sup>と有意に抑制された。組織学的にもAG投与すると一定面積当たりのiNOS、8-OHdG、ニトロタイロシンの陽性数(陽性数/10<sup>4</sup> fm<sup>2</sup>)は有意に抑制され、iNOSは4.5 +/- 1.0対8.5 +/- 5.2、8-OHdGは81.0 +/- 9.1対96.5 +/- 15.9、

ニトロタイロシンは8.8 +/- 4.2対15.3 +/- 5.1といずれもAG投与群対非投与群、移植後100日後の腫瘍組織の結果であった。

【0021】3. 増殖促進因子の単離・同定

1で示したように、この間質組織から培養線維芽細胞を樹立し、そのconditioned medium (CM)中にはFPCK-1-1細胞の増殖を2倍程度促進する液性因子が含まれていた。この因子は、100kDa以上の分子量を持ち、熱(37, 56, 100℃)に安定であり、ノイラミダーゼ処理に耐性、トリプシン処理に感受性であった。この因子を産生する線維芽細胞は、プラスチックプレート反応間質細胞のみであり、ヌードマウス皮下組織から樹立した線維芽細胞やNIH3T3, C3H10T1/2細胞からの産生は認められなかった。これらの癌化に伴う原因因子を同定することを目的に、FPCK-1-1細胞とFPCKpP1-3細胞間の蛋白質を2次元電気泳動法によって比較した。その結果、いくつかのスポットのうち、ファスシンが癌化に伴って増加することを認めた。

【0022】即ち、二次元電気泳動法にてFPCK-1-1細胞とFPCKpP1-3細胞間の蛋白質を2次元電気泳動法によって比較した。方法は、各培養付着細胞をリン酸緩衝液(PBS)にて洗浄後、ラバーポリスマンを用いて回収後1200rpm、4℃で遠心する。PBSにてさらに2度洗浄後、100マイクロリットルの細胞ペレットを10倍量の超音波破碎用バッファ(10mM Tris-HCl, pH7.4, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 50 μg/ml RNase, 1mM フェニルメチルスルホニルフロリド(PMSF)に浮遊する。細胞浮遊液は超音波破碎機(Tomy Seiko Co., Ltd)にて計3回超音波破碎する。この際サンプルを氷温に保つために各破碎の間を15秒間空けている。その後、5分間氷温静置してからDNase I (50 μg/ml)を加え、さらに氷温15分間静置する。その後固体状尿素を9Mになるように添加する。これに等倍の溶解用バッファ(9.2M 尿素, 2% Nonidet-P40; 1.6% pH範囲5~7と0.4% pH 範囲3.5~10と5%の2-メルカプトエタノールから成る2% Ampholine (商品名、LKB))を加え-70℃に保存する。

【0023】二次元電気泳動は二次元用のゲルには10%ポリアクリルアミドを用いた。酸性ポリペプチド用一次元目の泳動は、4% (w/v) 2%のAmpholines(商品名)(1.6%, pH 5-7; 0.4%, pH 3.5-10)を含むポリアクリルアミドゲルを用いて18℃, 200 Vで一時間、400 Vで12.5時間、800 Vで一時間泳動した(IEF)。塩基性ポリペプチド用の泳動に用いたゲルは、2% Ampholines (商品名)(1.0% pH 7-9, 1.0% pH 8-9.5)を除く上述のゲルを使用し、450Vで4時間泳動する(NEPHGE)。

【0024】分離したタンパクスポットは、膜に転写後違いのあるスポットを切り抜き、抽出後アミノ酸シーケンスを試みた。スポットを切り出し直接アミノ酸配列を決定しようとしたが、うまく行かなかった為に、切り出したスポット部から抽出した蛋白質をCNBr処理を行

い、得られた3つのフラグメントをHPLC分離後、改めて自動アミノ酸配列決定操作にかけた。その結果次の3つのフラグメントに対するアミノ酸配列が決定できた。即ち得られた配列SLIWHYNNENというもののうち、確実性が高い配列は少ない為にMXLIモチーフをコンピュータ処理 (TagIdent Search on the ExPASy www Server) でホモロジーを検索した所、その電気泳動上の挙動から分子量、pI等を考慮し、更に酵素消化で切断される部位の同等性から今回見出した差が明確に認められた蛋白質はファスシンであると結論つけた。

【0025】4. RT-PCRによる大腸癌と非癌組織部位との間のmRNA存在量の差の確認方法

ファスシンのコード領域の一部を挟むプライマー (フォワードプライマー: ggcaaggatgagctctttiga (配列番号1)、リバースプライマー: cccagtgcttgaatagaag (配列番号2)) を作製し、 $\beta$ アクトニン検出用に対応するプライマーを合成し、multiplex PCRによる比較ができる条件を決めた。その結果、mRNAレベルにおいてもファスシンが癌化に伴って増加することが明らかになった。その条件の詳細は以下の通りである。

【0026】RTの条件

Trizol (商品名) でRNAを抽出 (Dish 1枚) し、5  $\mu$ ls バッファ (4.0  $\mu$ l) 中0.1M DTT; 1.5  $\mu$ l、5mM MgCl<sub>2</sub>; 2.0  $\mu$ l、2.5mM dNTP; 4.0  $\mu$ l、5  $\mu$ M ファスシン特異プライマー (上述); 1.0  $\mu$ l、逆転写酵素MML-V; 1.0  $\mu$ l、RNA (3  $\mu$ g); 6.5  $\mu$ l、合計20.0  $\mu$ lを用い65°C  $\times$  10min  $\rightarrow$  4°Cに放置し、次に37°C  $\times$  60min  $\rightarrow$  95°C  $\times$  5min  $\rightarrow$  4°Cという条件で反応させた。

【0027】Duplex PCR (fascin, actin)

10  $\mu$ lユニバーサルバッファ 2.5  $\mu$ l、2.5mM dNTP 2.0  $\mu$ l、5mM ファスシンフォワードプライマー (上述) 2.5  $\mu$ l、5mM ファスシンリバースプライマー (上述); 2.5  $\mu$ l、5mM  $\beta$ -アクトニンフォワードプライマー (ttcgagcaagagatggccacggct (配列番号3)) 0.5  $\mu$ l、5mM  $\beta$  \*

<110> FUJIREBIO INC.

<120> Method for detecting cancer and method for evaluating whether process to cancer is proceeding

<130> 00683

<160> 4

【0033】

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Nucleic acid used as forward primer for amplifying a region in fascin cDNA

<400> 1

ggcaaggatg agctcttttg a

【0034】

\*  $\beta$ -アクトニンリバースプライマー (atactcctgcttgcgacacat (配列番号4)) 0.5  $\mu$ l、Taqポリメラーゼ 0.2  $\mu$ l、RT-Product 1.0  $\mu$ lに脱イオン蒸留水 13.3  $\mu$ lを加え、全量25.0  $\mu$ lの反応物を、94°C  $\times$  5分  $\rightarrow$  [94°C  $\times$  20秒  $\rightarrow$  56°C  $\times$  30秒  $\rightarrow$  72°C  $\times$  30秒]  $\rightarrow$  72°C  $\times$  7分  $\times$  30サイクルというサイクルでPCR増幅反応を行った。なお、このPCRにより、GenBank Accession No. AF030165 (配列番号5) に記載されているファスシンcDNAのコード領域の875nt~1066ntの領域が増幅される。

10 【0028】樹立した変異株を用いてDuplex PCRを行い、ファスシン遺伝子の発現増加を確認した。発現増加率の数値は、ATTO Lane Analyzer 3.0 (densitograph software library) ソフトを用いて算出した。その測定結果を図1に示す。

【0029】5. 13例の新鮮大腸癌手術摘出標本 (家族性大腸腺腫症患者を含む) について、4に記載した方法により大腸癌と近接正常組織のファスシン発現を比較したところ、13例中10例で増加していた。その結果を図2に示す。

20 【0030】6. 癌細胞株中のファスシン遺伝子発現プロファイル検討

4に記載した方法により8系のヒト大腸癌細胞株 (CHCY-1, Colo320, DLD-1, DM314, HT29, KM12, SW840, WiDr) のファスシン発現を比較したところ、全ての細胞株でファスシンが高発現することが明らかになった。その結果を図3に示す。

【0031】

【発明の効果】本発明により、早期癌を検出することが可能な癌の検出方法及び前癌状態から癌化の進行の有無の判定方法が初めて提供された。本発明の方法によれば、早期癌を検出することが可能になるので、癌の予防及び治療にとって非常に有用である。

【0032】

【配列表】

9

10

<210> 2  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Nucleic acid used as reverse primer for amplifying a region in fa  
 scin cDNA  
 <400> 2  
 ccccgatgct tggaatagaa g

[0035]

10

21

<210> 3  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Nucleic acid used as reverse primer for amplifying a region in be  
 ta-actin cDNA  
 <400> 3  
 ttcgagcaag agatggccac ggct

[0036]

20

24

<210> 4  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Nucleic acid used as reverse primer for amplifying a region in be  
 ta-actin cDNA  
 <400> 4  
 atactcctgc ttgctgatcc acat

[0037]

30

24

<210> 5  
 <211> 1720  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapience  
 <400> 5  
 caggggggttc gtgacgccgg ctgggtctgg gggtctggg ccagccgagc cgaccggggc 60  
 ttctggggga ccgcgggggc cgtgagcact cagaggggtgc atccaggcc cctccgggga 120  
 cccggccagc ctgaagatgc cgacgaacgg cctgcaccag gtgctgaaga tccagtttgg 180  
 cctcgtcaac gacactgacc gctacctgac agctgagagc ttcggttca aggtcaatgc 240  
 ctcggcacc agcctcaaga ggaagcagac ctgggtgctg gaaccggacc caggacaagg 300  
 cacggctgtg ctgctccga gcagccacct gggccgctac ctgtcggcag aagaggacgg 360  
 gcgcgtggcc tgtgaggcag agcagccggg ccgtgactgc cgcttcttgg tcctgccgca 420  
 gccagatggg cgctgggtgc tgcgtccga gccgcacggc cgcttcttgc gaggcaccga 480  
 ggaccagctg tcctgcttgc ccacagccgt ttccccggcc gagctgtgga ccgtgcacct 540  
 ggccatccac ccgaggggcc acctgctgag cgtgagccgg cggcgctacg tgcacctgtg 600  
 ccccggggag gacgagatgg ccgcagacgg agacaagccc tggggcgtgg acgcccctct 660  
 caccctcatc ttccggagcc gacggtactg cctcaagtcc tgtgacagcc gctacctgcg 720  
 cagcgacggc cgtctggtct gggagcctga gccccgtgcc tgctacacgc tggagttaa 780  
 ggcgggcaag ctggccttca aggactgcga cggccactac ctggcaccgc tggggcccg 840  
 aggcacccic aaggccggcc gaaacacgcg acctgggaag gatgagctct tgaatcgg 900

11

12

```

ggagagtcac ccacaggtgg tgctggtggc tgccaaccac cgctacgtct ctglcggca 960
aggggtcaac gtcicagcca atcaggatga tgaactagac cagcagacct tcctgatgca 1020
aatlgaccag gagacaaaga agtgcacctt ctatccagc actggggggt actggacct 1080
gglcacccat gggggcattc acgccacagc cacacaagtt tctgccaaca ccatgttga 1140
gatggagtgg cgtggccggc gggtagcact caaagccagc aacgggcgct acgtgtgcat 1200
gaagaagaat gggcagctgg cggctatcag cgattttgtc ggcaaggacg aagagttcac 1260
cctcaagctc atcaaccggc ccatcctggt gctgcgcggc ctggacggct tctgtgcca 1320
ccaccgggc tccaaccagc tggacaccaa ccgctccgtc tacgacgtct tccacctgag 1380
cttcagcgac ggcgcctacc ggatccgagg ccgcgacgga gggttctggt acacgggcag 1440
ccacggcagc gtgtgcagcg acggcgaacg cgccgaggac ttcgtcttcg agttccgtga 1500
gcgcggccgc ctggccatcc gcgcccggag cggcaagtac ctgcgcggcg gcgcctcggg 1560
cctgtgcgg gcgatgccg acgccccggc cgggaccgag ctttgggagt actgaggccg 1620
cgccagacc agcctgtcgc gcattaaaac cgtgtctctc ccgcaaaaaa aaaaaaaaaa 1680
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1720

```

【図面の簡単な説明】

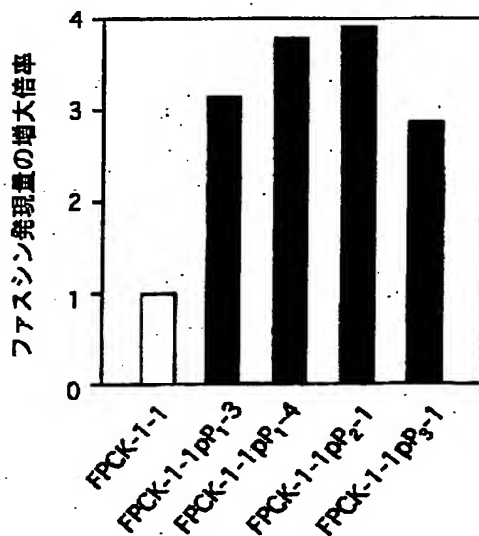
【図1】樹立した各種ヒト大腸癌セルライン中の、RT-PCRにより測定したファスシンmRNA量を、その親株であるヒト大腸腺腫セルラインFPC-1-1中のファスシンmRNA量と比較して示す図である。

【図2】新鮮大腸癌手術摘出標本について、実施例記載\*20

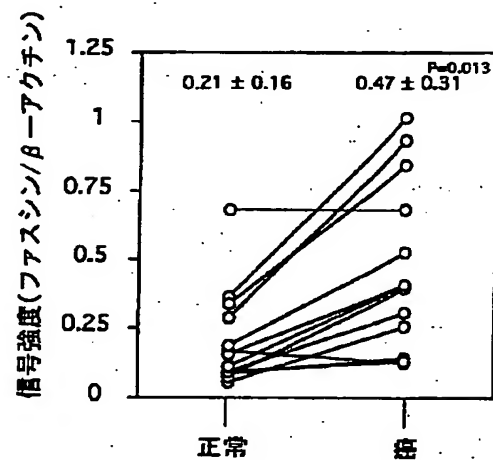
\*の方法により大腸癌と近接正常組織のファスシン発現を比較した図である。

【図3】実施例記載の方法により、8系のヒト大腸癌細胞株(CHCY-1, Colo320, DLD-1, DM314, HT29, KM12, SW840, WiDr)のファスシン発現を比較した図である。

【図1】

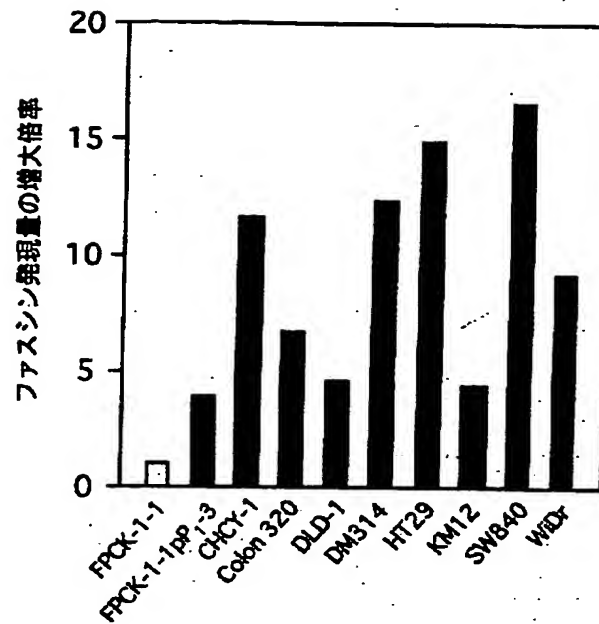


【図2】





【図3】



フロントページの続き

F ターム(参考) 4B024 AA12 BA80 CA20 HA11  
 4B063 QA01 QA13 QA18 QQ02 QQ03  
 QQ53 QR08 QR62 QS02 QS25